* 本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
* 下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。
http://metallogenics.co.jp/

【測定の意義】

生体は、呼吸により酸素をエネルギー産生に利用する一方、その過程において活性酸素を生成します。活性酸素は生体成分と速やかに反応し、生体の機能や構造に悪影響を及ぼします。このため生体は、有害な活性酸素を消去するための様々な抗酸化機能を有しています。活性酸素の生成と消去のバランスが崩れ、活性酸素の生成に傾いた状態が酸化ストレスです。近年、酸化ストレスは様々な疾患・病態に関与する事が明らかにされてきています。

ヘム代謝物である胆汁色素の一つ、ビリルビンは生体内の強力な低分子抗酸化物質です。ビリルビンは抗酸化栄養素とは異なり摂取量による変動が無いため、血中濃度は通常一定です。また、ビリルビンは分子内水素結合を形成する特異な分子構造のため、疎水性から親水性への相互変換が可能であり、細胞膜を自由に通過します。このため、血液循環系に限らず、組織や細胞内にも普遍的に存在する理想的な低分子抗酸化物質です。

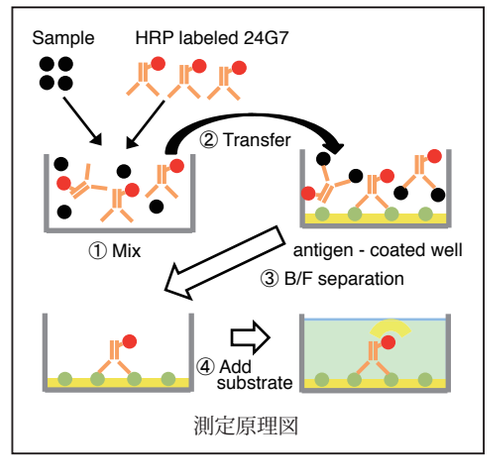
バイオピリンは、自殺的抗酸化物質であるビリルビンが活性酸素と反応した際に生じる最終酸化産物です。バイオピリンは、ビタミン C や E など他の抗酸化栄養素とは異なり、生体中のレドックス環境によりビリルビンに還元されることはなく、速やかに尿中に排泄されます。このため、酸化ストレスにより消費されるビリルビン量の増加は、尿中バイオピリン量の増加として現れます。これらの特徴から、バイピリンは、生体内のレドックス状態を示すリアルタイム型の酸化ストレスマーカーとして期待されています。

尿中バイオピリンレベルは外科的ストレス、虚血性心疾患、敗血症、心身症および心理的・社会的ストレスなどで応答すると報告されています。

【測定原理】

本キットはバイオピリンに特異的である抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 を用いた競合法 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) キットです。

1. HRP 標識抗体と試料中のバイオピリンとを反応させます。
2. 反応液を抗原を固相化したウェルに移します。未反応な標識抗体が抗原を介してウェルに結合します。
3. ウェルに結合しなかった抗体を洗浄操作により除去します。
4. 発色基質を加え、吸光度を測定し、検量線よりバイオピリン濃度を求めます。



測定原理図

【キットの内容】

合計 96 測定分 (商品コード：BP01D)

1.	抗原固相化 96 穴マイクロプレート	× 1	(遮光)	
2.	96 穴マイクロプレート (未処理)	× 1		
3.	HRP 標識 24G7 抗体 (100 x)	0.17 mL × 1		
4.	抗体希釈液	17 mL × 1		●
5.	サンプル希釈液	25 mL × 1		●
6.	標準試料：6.4 u/L バイオピリン *	× 1	(遮光)	
7.	発色基質 (TMB)	12 mL × 1		
8.	反応停止液 (1 mol/L 硫酸)	12 mL × 1		●
9.	洗浄液 (10 x)	20 mL × 1		●
10.	マイクロプレートシール	× 1		

*1u とは、抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 のエピトープ 1 μmol 相当量です。

【キット付属品以外に必要なもの】

- マイクロプレートリーダー
- マイクロプレートシェーカー
- メスシリンダー
- サンプルチューブ
- ペーパータオル
- マイクロピペットおよびチップ
- マルチチャンネルピペット
- マルチチャンネルピペット用　リザーバー
- 精製水

【オペレーション】

1. 試薬の準備

(1) 標準試料 (6.4 u/L バイオピリン) の調製

ラベルに記載された量のサンプル希釈液にて溶解させます。

(2) 標準試料の準備

下表のように標準試料をサンプル希釈液にて溶解し、希釈系列を調製してください。

バイオピリン濃度 (u/L)	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4
6.4 u/L 標準試料 (μL)	5	10	20	40	80	160	320
サンプル希釈液 (μL)	315	310	300	280	240	160	0

(3) HRP 標識 24G7 抗体試薬の調製

HRP 標識 24G7 抗体 (100 x) 1 本を抗体希釈液 1 瓶へ添加します。

(4) 洗浄液の希釈

洗浄液 (10 x) 1 本を精製水 180 mL で希釈します。

2. 試料の調製

尿：サンプル希釈液にて、3 倍以上に希釈してください。

3. 測定操作

(1) サンプル希釈液、各標準液、検体を未処理の 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 4 µL ずつ分注します。(各 2 ウェルずつ)。

プレート上の配置例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	▲	▲	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○

▲：サンプル希釈液
●：標準試料
○：試料

(2) 各ウェルに HRP 標識 24G7 抗体試薬 140 µL を添加し、マイクロプレートシールを貼り付けます。

(3) 反応液をマイクロプレートシェーカーにて振とうし、遮光下、室温で 1 時間反応させます。

(4) (3) の終了直前に抗原固相化 96 穴マイクロプレートのウェルを洗浄します。

洗浄後はウェルが乾燥しないうちに速やかに (5) へ進みます。

※洗浄操作

a) 洗浄液 300 µL をウェルに添加します。

b) 洗浄液を破棄します。

c) a) から b) を 2 回繰り返します (合計 3 回)。

d) ペーパータオルに叩きつけるようにして液を切ります。

(5) 各反応液 100 µL を、洗浄した抗原固相化 96 穴プレートのウェルに添加します。

(6) 遮光し、マイクロプレートシェーカーで振とうした後、室温で 30 分間反応させます。

(7) 反応液を廃棄し、(4) と同様に洗浄します。

(8) 発色基質 100 µL を各ウェルに添加します。

(9) 遮光し、マイクロプレートシェーカーで振とうした後、室温で 30 分間反応させます。

(10) 反応停止液 100 µL を各ウェルに添加し、450 nm の吸光度を測定します。

4. 測定値の算出

(1) 2 重測定した吸光度の平均値を求めます。

(2) 標準液濃度の対数に対する吸光度をプロットし、検量線を作成します。

(3) 検量線より検体のバイオピリン濃度を読み取ります。

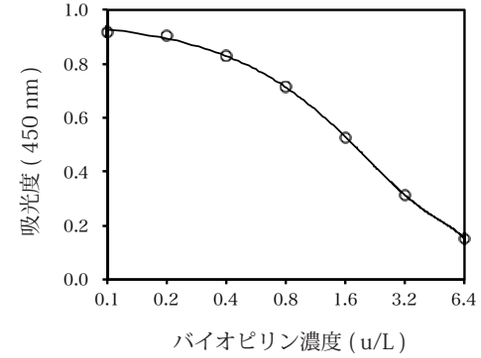


図 . 検量線の例

【注意事項】

- 試料は採取後、すみやかに測定または凍結保存 (-30℃以下・遮光) してください。
- 試料中のビリルビンは正誤差を与えます。
- 標準試料、抗原固相化プレートおよび試料はできるだけ遮光してください。
- 別ロットの試薬は使用しないでください。
- 未使用の抗原固相化ウェルは乾燥剤を同封の上、チャック袋で保管してください。
- 発色基質は光が当たらないように注意して下さい。
- 検量線は測定毎に作成してください。
- ウェル間の発色反応時間の誤差を防ぐため、発色液や反応停止液の添加にはマルチチャンネルピペットの利用をお勧めします。
- 洗浄後の抗原固相化ウェルは、測定終了まで乾燥させないでください。
- HRP 標識 24G7 抗体 (100 x)、抗体希釈液およびサンプル希釈液は微量のアジ化ナトリウムを含有しています。取扱いにご注意ください。

【主な仕様と性能】

測定範囲	0.1 ～ 6.4 u/L *
アッセイ数	96 well
測定方法	競合法 ELISA
測定波長	450 nm
測定試料	尿
感度	サンプル希釈液をブランクとして測定した時の OD は 1.4 ～ 0.7 の範囲内です。
同時再現性	同一試料を 5 回測定した時の C.V. は 10% 以内です。

*1u とは、抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 のエピトープ 1 μmol 相当量です。

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。(冷蔵 2 ～ 8℃)
開封後は冷暗所 (2 ～ 8℃) で保存し、1 週間以内に使用してください。

【参考文献】

1. Yamaguchi, T., Shioji, I., Sugimoto, A., Komoda, Y., & Nakajima, H. Epitope of 24G7 anti-bilirubin monoclonal antibody. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1289 (1), 110-114. 1996
2. 山口登喜夫 ; 杉本昭子 . 低分子抗酸化物質 (ビリルビンの抗酸化作用を主に). 2009.

【製造販売業者】

メタロジェニクス株式会社
千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ

※レドックスアッセイ ™ は、メタロジェニクス（株）の 試薬キットの名称です。

問い合わせ先

メタロジェニクス株式会社　営業部
〒 260-0856　千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ
TEL：　043-227-6767
FAX：　043-227-6768
e-mail：　sales@ak-j.com
URL：　http://metallogenics.co.jp/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーでご確認下さい。
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダーを用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No. を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。

バイオピリン ELISA キット測定フローチャート